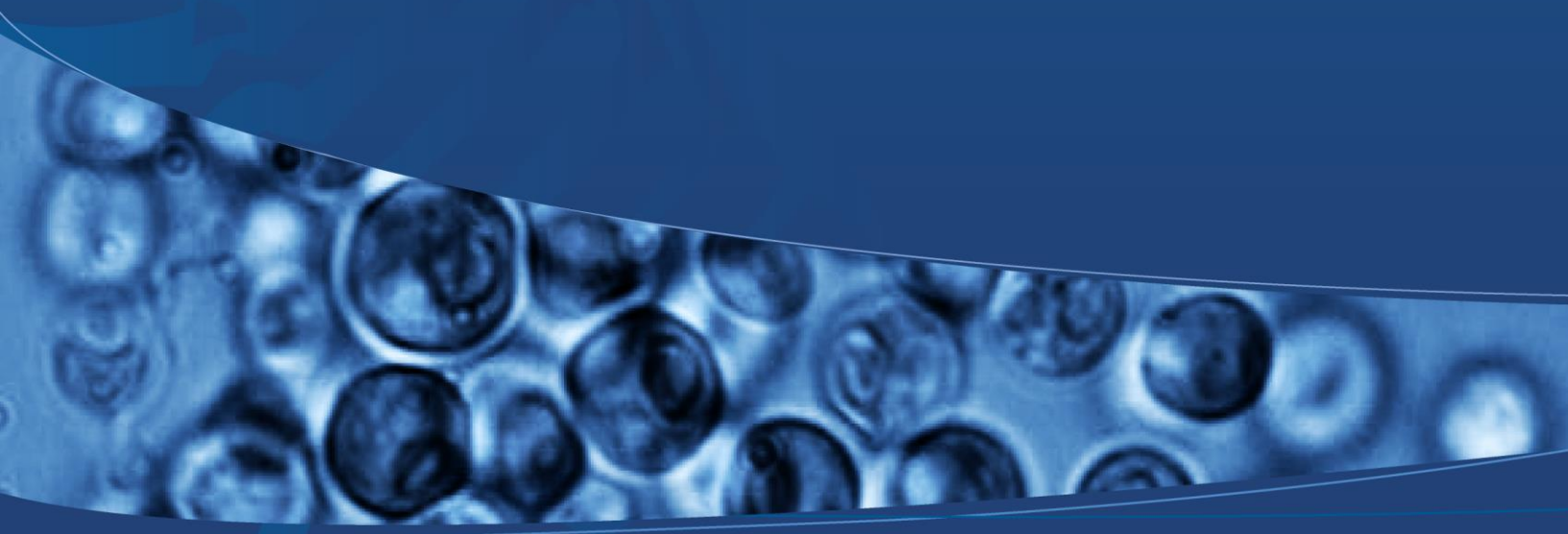
Revista de la Sociedad Mexicana de

Biotecnología y Bioingeniería A.C.



Año 2016 Volumen 20 Número 2
ISSN 0188-4786

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotecnología
y Bioingeniería A.C.

MESA DIRECTIVA

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Vice-Presidente

Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz
Secretario

Dra. María Teresa Torres Mancera
Tesorero

Dra. Sylvie Leborgne
Subsecretario

Dr. Aldo Amaro Reyes
Vocal Profesional

Ing. Diana Victoria Melo Sabogal
Vocal Estudiante

TRABAJO DE EDICIÓN

M. C. Olga Berenice Álvarez Pérez

COMITÉ EDITORIAL

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Editor en Jefe
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM-I

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Víctor Manuel Loyola
Centro de Investigación Científica de Yucatán

DISEÑO GRAFICO E IMAGEN

Lic. Nayeli Quinto **(SODIO NET)**

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica smbb1982@gmail.com

Índice

EDITORIAL

Biotecnología en Iberoamérica y Reflexiones sobre las Implicaciones de la Biotecnología

Carlos Regalado González **4**

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES **6**

ARTÍCULOS

El Potencial Redox Intracelular y su Importancia en Biotecnología

Frania J. Zúñiga-Bañuelos y Laura A. Palomares **11**

Cultivo de Células Animales Sincronizadas en Biorreactores como un Nuevo Modo de Operación para Optimizar la Producción de Proteínas Recombinantes

Elena Mendoza; Vanessa Hernández y José A. Serrato **26**

Biotecnología en Iberoamérica y Reflexiones sobre las Implicaciones de la Biotecnología

Recientemente, del 5 al 8 de junio del presente año, se celebró en la ciudad de Salamanca, España, el Primer Congreso Iberoamericano de Biotecnología "Iberoamérica 2016" con el objetivo de aglutinar experiencias de miembros de las diferentes sociedades de biotecnología que involucran a iberoamérica. En esta reunion participamos representantes de la Sociedad Española de Biotecnología, Sociedad Portuguesa de Biotecnología, Sociedad Brasileña de Biotecnología, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería y Asociación Colombiana de Biotecnología, además de investigadores de Costa Rica, Chile, Reino Unido y países de Europa del Este. Este entorno iberoamericano permitió englobar el acervo cultural, además de un conocimiento más globalizado que ayudó a una comunicación más directa entre los investigadores con temas comunes de investigación que puede servir como punto de contacto para posteriores colaboraciones y permitir obtener sinergias necesarias para resolver problemas concretos de importancia relevante para la sociedad. Como una continuación de esta reunión, se acordó realizar el segundo Congreso Bioiberoamericano en nuestro país, siguiendo una estrategia bianual, que correspondería al año 2018. Este compromiso nos permite reflexionar acerca de la celebración de manera conjunta con este grupo de sociedades biotecnológicas nuestro propio congreso y por única ocasion celebrarse en dos años consecutivos. Sin embargo, esta opción deberá repensarse y someterse a consenso de los socios estudiantes, profesionales, numerarios y ex-presidentes para conocer los puntos de vista desde diferentes perspectivas y obtener la decisión más provechosa para nuestra sociedad.

Por otro lado, la organización para la cooperación y desarrollo económicos (OCDE) considera que la biotecnología ha tenido un impacto creciente en los programas de diferentes sectores tales como agricultura y comercio; ambiente, ciencia, tecnología e industria; por lo cual en 1993 fue establecido el grupo interno de coordinación para la biotecnología (ICGB) para facilitar la coordinación entre los sectores mencionados. En Julio de 2016 se publicó el último reporte sobre "Actualización en Biotecnología" correspondiente a Julio de 2016 (file:///Users/CARLOS/Documents/SMBB%202016/EDITORIAL%20BIOTECNOLOGI%CC%81A%20AGOSTO/EDITORIAL.pdf). En esta nueva comunicación destaca entre otros muchos e interesantes tópicos de la biotecnología, el "Microbioma, dieta y salud". Aquí se menciona que dada la disponibilidad de las tecnologías "ómicas", los microorganismos pueden caracterizarse como parte de una comunidad, por lo cual los microbiomas pueden ser caracterizados de manera descriptiva basados en la identificación de sus genomas, pero también puede mejorarse el conocimiento sobre el funcionamiento del microbioma intestinal humano, creando expectativas para tratamientos novedosos basados en intervenciones dirigidas al microbioma que contribuyan a

la medicina preventiva, para obtener sistemas de salud sostenibles. Otro aspecto novedoso que se destaca es la “Edición del genoma” que se refiere a un grupo de técnicas para manipular el genoma que permiten obtener una mayor precisión que las formas pre-existentes de ingeniería genética. La más conocida es el sistema CRISPR/Cas9 que es una mecanismo de defensa adaptativa usado por Archeas y bacterias para degradar material genético extraño.

La edición de genomas tiene importantes implicaciones para innovaciones en biomedicina, agricultura y biotecnología industrial por ser más exacta, barata y sencilla. Además de sus implicaciones económicas y científicas la edición genética tiene aspectos éticos y regulatorios para países miembros y no-miembros de la OCDE. Aspectos de propiedad intelectual, ética en la manipulación de líneas germinales humanas y riesgos potenciales a la salud son entre los más importantes. Este es un concepto emergente en la convergencia de bio- y nanotecnología, que requiere una mayor discusión entre científicos, formadores de políticas y el público en general para definir las fronteras en que esta nueva tecnología pueda desarrollarse.

La OCDE también ha descrito los objetivos más importantes del milenio para una mejor convivencia humana: 1. Erradicar la pobreza extrema y el hambre, 2. Alcanzar una educación primaria universal, 3. Promover igualdad de género y empoderamiento de la mujer, 4. Reducir la mortalidad infantil, 5. Mejorar la salud materna, 6. Combatir el HIV/SIDA, malaria y otras enfermedades, 7. Asegurar la sostenibilidad ambiental, 8. Desarrollar una cooperación global para el desarrollo.

Investigadores de instituciones mexicanas que participaron en en el congreso

Dr. Carlos Regalado González
Profesor-Investigador
Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro
Presidente de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería
carlosr@uaq.mx, regcarlos@gmail.com

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original así como de revisión en los campos de la biotecnología y bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas de la revista son el Español y el Inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones de trabajos originales y revisiones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, µl), de peso (kg, g, mg, µg), DNA, RNA y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde sus aspectos fundamentales hasta las aplicaciones de los mismos, incluyendo: microbiología, bioquímica y biología molecular, procesos y proyectos, así como biotecnología marina y biotecnología aplicada a la salud, alimentos, agricultura, veterinaria, enzimas y ambiente.

Los trabajos de investigación original serán divididos en las siguientes secciones: **Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Referencias y Agradecimientos**. Las secciones de **Resultados y Discusión** pueden presentarse combinadas.

Los trabajos de revisión incluirán el tema y subtemas que a juicio de los autores sean necesarios para la mejor presentación de la información. Estos trabajos pueden cubrir los siguientes contenidos:

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.

2. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología. Por ejemplo: las perspectivas del uso de los genomas para el desarrollo de nuevas drogas o para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático de los genes y sus aplicaciones), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o

conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería genética para hacer ingeniería metabólica. Los nuevos tipos de reactores biológicos y los fenómenos de transporte implicados. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuacultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.

4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.

5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.

6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito será puesto en **negritas** con letra Arial o equivalente tamaño **14**. El título deberá estar centrado.

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.

3. Se deberá añadir un **Resumen** de no más de 250 palabras en Español y un **Abstract** en Inglés de tamaño similar.

4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave:** que permitan clasificar el artículo en una base de datos.

Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words:**).

5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en *cursivas* con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño **10**. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.

6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las **Referencias**.

7. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información original, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez &

García (1999) han demostrado que...", o bien, "Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...". Si la cita posee varios autores se escribira como sigue: "Gutiérrez *et al*. (2003), han demostrado…." O bien: "Datos recientes (Gutiérrez *et al*., 2003) han mostrado…" Si la cita es es una página de Internet, ésta deberá ponerse completa entre paréntesis directamente en el texto donde se mencione. La lista de **Referencias** se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño **10**) de acuerdo al siguiente formato:

Para revistas:

García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6454-6459.

Para libros y capítulos de libros:

(Libro)

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

(Capítulo de libro)

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *In:* Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology

(EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Para patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Para congresos y reuniones: *Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo.*

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del Complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de Aspergillus HL. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Para citas provenientes de internet: *Se aceptará un máximo de dos citas de este tipo.*

Van Deuren J, Wang Z & Ledbetter J (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. *Technology Innovation Office, EPA*. Disponible en: *http://www.epa.gov/tio/ remed.htm.*

Revistas electrónicas:

Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of Aspergillus niger disclosed by comparative metabolic genomics. Genome Biol. 8: R182. BioTecnología, Año 2015, Vol. 19 No. 1 11

Para tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de Ditaxis heterantha para la Producción de safranal. Tesis de Maestra en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea. Las citas de internet, congresos y reuniones, deberán evitarse al máximo.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos. Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico al Comité Editoral encabezado por el Dr. Sergio Sánchez Esquivel en la dirección sersan@biomedicas.unam.mx Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide Incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC http://www.smbb.com.mx/ La publicación en línea precederá a la publicación impresa

El Potencial Redox Intracelular y su Importancia en Biotecnología

Frania J. Zúñiga-Bañuelos y Laura A. Palomares*

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos 62210 México. franiazb@ibt.unam.mx *Autor para correspondencia: laura@ibt.unam.mx

RESUMEN

Potencial redox es la capacidad de trasferir electrones de una especie química a otra. Su complejidad en sistemas biológicos requiere su estudio desde varios puntos de vista. Se sabe que cada organelo tiene su propio equilibrio redox, el que cambia a medida en que la célula crece y transita por las distintas fases del ciclo celular, constituyendo un sistema dinámico. El papel del potencial redox en los procesos celulares está aún en estudio. El potencial redox ha sido utilizado para el monitoreo y control de cultivos anaerobios y para diferenciar eventos metabólicos de eventos operacionales en cultivos de células animales. El estudio del potencial redox ha sido clave para entender ciertas enfermedades como Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Esta revisión es una breve recopilación de la información disponible sobre cómo el potencial redox influye en la fisiología celular y como puede ser aprovechado en biotecnología**.**

Palabras clave: Potencial redox intracelular, especies reactivas de oxígeno, plegamiento de proteínas, potencial redox del cultivo, antioxidantes, envejecimiento.

ABSTRACT

Redox potential is the ability to transfer electrons from a chemical species to another. The complexity of the cell requires a systematic view of the redox potential. It is known that each organelle has its own redox equilibrium, which can change at the various cell cycle phases, constituting a dynamic system. The role of the compartmentalized redox potential in cellular processes is still under investigation. Redox potential has been used as a control parameter in aerobic fermentation, as well as to distinguish operational from metabolic events in animal cell cultures. Furthermore, redox potential has been key for understanding certain diseases such as Parkinson`s Alzheimer`s and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This review is a brief recompilation of the available information of how redox potential determines cellular physiology and its use in biotechnology.

Keywords: Intracellular redox potential, reactive oxygen species, protein folding, culture redox potential, antioxidants, aging.

INTRODUCCIÓN

El potencial redox se refiere a la capacidad de una especia química de donar o aceptar electrones (oxidarse o reducirse, respectivamente). El potencial redox intracelular (PRI) es el sistema óxido reductor que refleja la estequiometría de diversas biomoléculas implicadas en el flujo de electrones, las que además inciden en procesos de regulación dependientes de la señalización y activación de factores transcripcionales. Una de las moléculas más importante del sistema redox es el glutatión (GSH), el cual se encuentra mayoritariamente en estado reducido dentro de la célula y su concentración va de 1 a 10 mM (Kalinina *et al.*, 2014). Además del glutatión, otras moléculas forman parte del sistema de regulación del PRI, como la tiorredoxina, $NADH/NAD^+$, $FAD^+/FADH$, $NADP^+/NADPH$, además de las enzimas involucradas en su reducción. El ambiente en un sistema redox es muy dinámico, pues las reacciones redox ocurren continuamente. Se habla de un potencial redox reductor (o negativo), cuando la estequiometría de una reacción redox se inclina hacia el aumento en la concentración de la molécula que recibe electrones (reducida). Por el contrario, existe un ambiente oxidante (potencial redox positivo) cuando aumenta la concentración de la especie que pierde electrones (oxidada).

Desde los años 1950, el interés sobre el potencial redox celular aumentó con el descubrimiento de radicales libres en tejidos celulares y vegetales como productos de las reacciones de óxido-reducción. Commoner *et al.* (1954) encontraron que los radicales libres provienen de reacciones catalizadas por enzimas involucradas en la fotosíntesis o en la formación de melanina después de la radiación ultravioleta o ionizante. Por otro lado, Harman (1956) propuso una teoría que relaciona a un alto contenido de especies reactivas de oxígeno con mutaciones, cáncer y el envejecimiento, cuando el sistema redox celular no es capaz de proteger a la célula de estos radicales. En consecuencia, diversos estudios se dirigieron hacia la comprensión de los mecanismos de homeostasis del redox celular y su importancia, especialmente para el entendimiento de patologías que afectan al ser humano.

Se ha reportado que el potencial redox intracelular afecta las siguientes funciones celulares:

1. Transporte.
2. Plegamiento de proteínas.
3. Señalización celular.

Es muy posible que otras funciones celulares también sean afectadas por el potencial redox. Ya que la biotecnología utiliza seres vivos, particularmente células, los procesos biotecnológicos están también determinados por el potencial redox. Esta variable se vuelve entonces importante desde dos enfoques, primero para el entendimiento de patologías humanas y animales y el desarrollo de estrategias de tratamiento, y segundo, para el desarrollo y mejora de los procesos biotecnológicos. En biotecnología, el potencial redox ha sido utilizado para el control de procesos de

tratamiento de aguas, de procesos anaerobios o microaerobios, e incluso de cultivo de células animales. El papel del potencial redox desde estos dos enfoques es presentado en este escrito, con la finalidad de explicar la importancia de conocer y entender el comportamiento del potencial redox ante distintas situaciones metabólicas celulares, así como reconocer su importancia en la biotecnología.

POTENCIAL REDOX A NIVEL SUBCELULAR

Los diversos estudios realizados para determinar el potencial redox en organelos de varios tipos de células han dejado en claro que el potencial redox se regula de manera independiente en cada compartimento celular y según la especie redox en cuestión, de manera que no se puede comparar el equilibrio de dos parejas de especies redox distintas o en diferentes compartimentos (Kemp *et al*., 2007).

Mitocondria

La mitocondria es el organelo con mayor actividad redox, pues contiene la cadena respiratoria a través de la cual sucede la transferencia de electrones desde los transportadores redox hasta el oxígeno como el último aceptor de electrones. La cadena respiratoria está formada por complejos metaloproteicos que bombean protones al espacio intermembranal, logrando la fuerza protón motriz necesaria para la producción de ATP. Al mismo tiempo, se ha demostrado la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el superóxido y peróxido, como subproductos de la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria, y su papel en la regulación de la apoptosis celular (Cai & Jones, 1998; Scialo *et al*., 2013). La determinación del estado redox en la mitocondria bajo diferentes condiciones celulares ha sido de gran interés por su relevancia para explicar la causa de algunas enfermedades. Se ha estudiado el equilibrio de especies redox encontradas en toda la célula que además son reguladas de manera independiente, como el par NADPH/$NADP^+$, tiorredoxina (Trx1, Trx2), GSH/GSSG (disulfuro de glutatión, glutatión oxidado) y Cys/CySS (Go & Jones, 2008). Mediante la cuantificación de la relación de GSH/GSSG en mitocondrias purificadas de hígado, se calculó un rango de potencial redox entre -330 y -300 mV (Kemp *et al*., 2007). Tiempo después, mediciones en mitocondrias de células de hojas de *Arabidopsis*, utilizando roGFP2, una proteína fluorescente sensible a redox, se encontró un potencial de -330 mV (Rosenwasser *et al.,* 2010). En mitocondrias de células HeLa, Hanson *et al.,* (2004) encontraron un potencial redox de -360 mV, que es altamente reductor, posiblemente en consecuencia de un alto grado de proliferación celular, pues se ha observado que cuando el potencial redox (referido a la especie GSH) se vuelve más reductor, aumenta la concentración celular (Hutter *et al.,* 1997), de manera que cumple una función importante en la regulación del ciclo celular. Se sabe que GSH está presente en el núcleo, se ha pensado que su papel señalizador consiste en mantener una

arquitectura nuclear apta para la expresión de genes (García-Giménez, *et al*., 2013).

En estudios más recientes, se ha comparado el impacto de la oxidación de glutatión dentro de la mitocondria, con el fin de conocer el tiempo de recuperación del potencial redox gracias a la actividad antioxidante de la célula. Para ello, Kolossov *et al.* (2014) transfectaron establemente células CHO con roGFP2 unida a Grx1 (Glutarredoxina 1), dirigida a mitocondria y citoplasma, añadieron diamida, un eficiente oxidante de tioles (Kosower *et al*., 1969; Rigobello *et al*., 2005) y retirándolo después de unos minutos, observaron el cambio del potencial redox mediante microscopía de fluorescencia en tiempo real, siguiendo el grado de oxidación de roGFP2. Ellos encontraron que el tiempo de vida media de recuperación del sensor es de 160±6s en mitocondria y 155±12s en citoplasma, valores muy cercanos. Sin embargo, cuando inhibieron la síntesis de GSH por BSO (Butinona sulfoxamina) en ambos compartimentos, hubo una diferencia importante en ambos compartimientos, resultando en un potencial redox más oxidante en la mitocondria, mientras que en el citoplasma el potencial redox regresó rápidamente a sus valores normales. Estos resultados resaltan la importancia del GSH en la capacidad de amortiguamiento del potencial redox en la célula, como lo han mencionado diversos trabajos en el tema (Ayer *et al*., 2014; Foyer *et al*., 2002). Esto indica que la respuesta a perturbaciones externas en el equilibrio redox es independiente para cada compartimento, ya que el control del exceso de moléculas oxidantes o reductoras, puede sujetarse a la presencia y concentración de antioxidantes, reguladores e incluso la producción de ERO, como lo propone Kolossov *et al*. (2015) para el caso de la cadena respiratoria en mitocondria.

Citoplasma

Durante estudios de superóxido en apoptosis, Cai & Jones (1998) compararon el potencial redox, calculado con la ecuación de Nerst, de las especies GSSG/GSH (-239 mV) en equilibrio contra el del par NADPH/NADP (-394mV), reportado por Sies (1982), en estado estacionario. Se observa que el primero tiene un balance más oxidante que el segundo, el cual funciona como cofactor para reducir el GSSG por la glutatión reductasa (Karplus & Shulz, 1989).

Retículo endoplásmico

El equilibrio redox en el retículo endoplásmico (RE) tiende a ser oxidante. La primer cuantificación fue realizada enzimáticamente por Hwang *et al.* (1992), siguiendo la metodología de Anderson (1985), encontrando que el estado redox celular global en células de hibridoma esta entre -233 y -239 mV, mientras que en RE obtuvieron un redox de -172 a -188 mV. En otro estudio en células de epidermis de tabaco, se comparó el potencial redox en citosol y RE al expresar roGFP2 en estos compartimentos, encontrando valores de -320±0.2 mV y -225±2.0 mV,

respectivamente, confirmando así un mayor grado de oxidación en RE (Schwarzländer *et al*., 2008). Actualmente se sabe que una de las funciones más importantes del retículo endoplásmico es recibir, plegar y ensamblar las proteínas que transitan por esta vía secretora, para lo cual, como se describirá más adelante, un entorno oxidante es imprescindible.

Golgi

Después de su descubrimiento hace más de 100 años, la complejidad de este organelo ha atraído el interés de muchos investigadores en diversos temas, uno de ellos es la forma en que funciona durante la respuesta celular para contender con el estrés oxidante. Se ha determinado el potencial redox en los lisosomas, utilizando la proteína roGFP dirigida a este sitio y se sabe que es de -240 mV (Austin *et al.*, 2005), mucho más oxidante que en mitocondria, pero similar al estado redox global en hibridoma, según Anderson (1985). A pesar de esta diferencia, los lisosomas se consideran los principales organelos en la modulación del estrés oxidante (Go & Jones 2008; Kurz, *et al.,* 2010). Aunque no se conoce el potencial redox en el Golgi, se han descrito mecanismos de respuesta ante estrés oxidante (Jiang *et al.*, 2011), por ejemplo cuenta con las bombas Ca^{2+}/Mg^{2+} ATPasas codificadas por los genes *ATPC1/ATP2C2* en mamíferos (Vanoevelen et al., 2005), que contribuyen a disminuir la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el citoplasma, lo cual es muy relevante, por ser iones involucrados en vías de señalización para la producción de ERO e inducción de apoptosis (Brookes et al., 2004; Görlach *et al.*, 2015).

En el Golgi también hay producción de antioxidantes por componentes en su membrana. La ubiquinona es el transportador de electrones y es un antioxidante (Nyquist et al., 1970; Crane *et* al., 1993; Maroz, et al., 2009), principalmente evitando la peroxidación lipídica relacionada a enfermedades cardiovasculares (Siegel, et al., 2014). Dos glutaredoxinas (Grx6 y Grx7) y parkin, se añaden a la lista de antioxidantes. Las primeras evitan la oxidación y posible degradación de proteínas citoplásmicas, lo que aumenta la resistencia de la célula al estrés oxidante (Mesecke *et al.,* 2008). Parkin fue localizada en el trans-Golgi por Kobo y colaboradores (2001). Posee un dominio ubiquitin en la región N-terminal y dos motivos tipo dedo de zinc. Fue llamada así porque es codificada por un gene que presenta amplias deleciones en pacientes con AR-JP ("*Autosomal recessive juvenile parkinsonism"*) (Kitada *et al.,* 1998). La sobreexpresión de parkin silvestre y mutado en células NT-2 y SK-N-MC por Hyun *et al* (2002) mostró que la concentración de lípidos peroxidados es más alta en las células expresando la mutante. Esto sugiere que estos componentes son vitales para conservar la homeostasis celular.

Interesantemente la regulación del potencial redox en cada organelo es distinta e independiente. Al parecer esto tiene relación con la función que cada uno desempeña en la célula. No obstante, el desequilibrio de las reacciones redox en tan

solo un compartimento célular puede causar una sucesión de eventos con impacto fisiológico, por ejemplo, el plegamiento ineficiente de proteínas como resultado de un exceso de radicales libres en el retículo endoplásmico (Iqbal *et al*., 2014; Karademir *et al*., 2015), que conduce a la formación de agregados proteicos y a diversas respuestas de estrés, como se describe a continuación.

IMPORTANCIA EN PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

Una de las funciones más importantes de las especies redox es la formación de puentes disulfuro a través de la oxidación de las cisteínas que poseen las proteínas. Este evento sucede principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y forma parte del proceso de maduración y estabilización de proteínas que finalmente serán secretadas o formarán parte de la membrana celular. El número de combinaciones posibles para el plegamiento de una proteína puede ser enorme, sin embargo, como lo propuso Anfinsen (1962) hace 50 años, el arreglo tridimensional de la cadena de aminoácidos es el más favorable, y la proteína contiene información que permite el correcto apareamiento de sus puentes disulfuro y así lograr la formación de otros entrecruzamientos covalentes que le den mayor estabilidad a la proteína. Actualmente se sabe que las reacciones que catalizan la formación de puentes disulfuro son realizadas por un amplio número de enzimas con actividad disulfuro isomerasa (PDI por sus siglas en inglés *"Protein disulfide isomerase"*), caracterizadas por tener un dominio tiorredoxina (Trx) (Edman *et al*., 1985). Cada una de estas proteínas tiene especificidad por su substrato, regulada por el número, localización y reactividad redox de los motivos Cys- Xaa- Xaa- Cys, de la proteína a plegar, así como de los valores de *pKa* de ambas cisteínas (Okumura *et al*., 2015).

El mecanismo de formación de puentes disulfuro se esquematiza en la figura 1. La primer reacción ocurre a partir de la PDI oxidada (PDIoxd), que, después de encontrarse con su substrato ditiol, genera la PDI reducida (PDIred) y el puente disulfuro en la proteína "cliente", luego un oxidante no enzimático o enzimático, como Ero1, reacciona con PDIred para generar nuevamente PDIoxd y H_2O_2. Lo anterior vuelve a repetirse iterativamente hasta formar los puentes disulfuro de la proteína "cliente" (Hudson *et al*., 2014). La complejidad de este mecanismo aumenta, pues otros pares redox contribuyen directamente a la oxidación de proteínas desplegadas, como GSSG, dehidroascorbato, peróxido de hidrógeno (Hudson *et al*., 2014), y miembros de la familia quiescin-sulfidril oxidasa (QSOX), muy abundante en eucariontes, que utilizan un dominio de tiorredoxina y un pequeño sitio de unión a FAD (Thorpe *et al*., 2002). Se sabe que la PDI contribuye a evitar la formación de agregados proteicos. Aunque estudios en pacientes con enfermedades neurodegenerativas han encontrado que PDI forma cuerpos de inclusión en células del sistema nervioso central (Iqbal *et al*., 2014).

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL POTENCIAL REDOX

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa que, en la mayoría de los casos, está relacionada con mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Atkin *et al*., 2008; Ezzi *et al.,* 2007; Laurindo *et al*., 2012). La SOD1 tiene un alto poder antioxidante, pues cataliza la conversión de superóxido a oxígeno y peróxido (Getzoff *et al*., 1983; Fridovich, 1995).

En estudios recientes se ha encontrado que las mutaciones adquiridas no siempre ocasionan la disminución de la actividad catalítica, sino por el contrario, generan nuevas propiedades catalíticas que incrementan la producción de radicales tóxicos, como en el caso de la actividad de

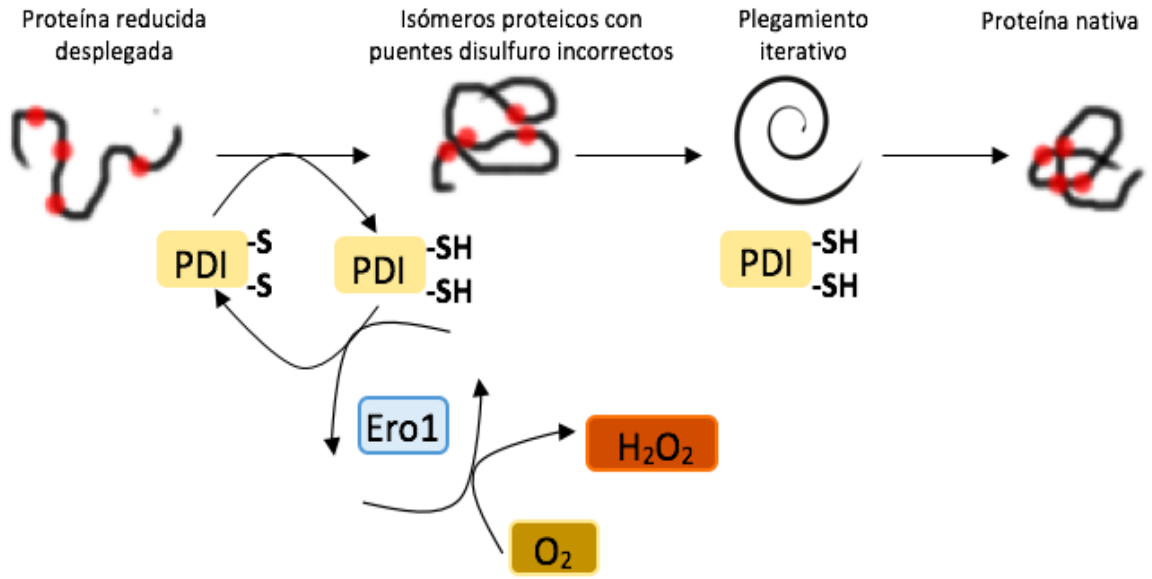


Fig. 1. Ejemplo del mecanismo formación de puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas. El proceso empieza con el péptido completamente reducido. La disulfuro isomerasa (PDI) oxidada cataliza la formación de puentes disulfuro entre las cisteínas. Los puentes disulfuro se forman de manera iterativa hasta que se obtiene el plegamiento funcional más estable, el que corresponde a la forma nativa de la proteína. Nótese que la presencia de oxidantes es necesaria para la regeneración de la PDI. La regeneración de la PDI puede ocurrir a través de reacciones catalizadas por enzimas, por ejemplo la Ero1, o a través de reacciones no enzimáticas.

SOD1/H_2O_2 dependiente de bicarbonato, que cataliza la oxidación de tocoferoles y lípidos insaturados (Goss *et al*., 1999). Más aún, nuevos estudios mostraron que los radicales generados por la SOD mutante ocasionan la oxidación, inactivación y agregación de PDI, provocando la pérdida del control de calidad durante el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico y la formación de cuerpos de inclusión en neuronas motoras (Iqbal *et al*., 2014; Karademir *et al*., 2015).

ENVEJECIMIENTO RELACIONADO CON POTENCIAL REDOX

Otra relación interesante entre el potencial redox y la salud, es con la longevidad y el envejecimiento. La teoría del envejecimiento

Basada en radicales libres (FRTA, por sus siglas en Inglés "*Free Radical Theory of Aging*") fue propuesta por Harman en 1956, quien publicó en 1993 una hipótesis sobre el origen de la demencia senil en relación con la disfunción celular y la acumulación de ERO en el cerebro, desde entonces, se han acumulado estudios que refuerzan o rechazan esta teoría. Por ejemplo, en un estudio realizado por Rebrin & Sohal (2004), en el que compararon la concentración de GSH/GSSG total y mitocondrial, además de proteína reactiva a sulfidrilos en hígado, cerebro, riñón, músculo esquelético y corazón, de dos cepas de ratones de distinta esperanza de vida, encontró que la proporción de GSH con respecto a GSSG, fue 32, 50 y 21% mayor en mitocondria de hígado, cerebro y músculo esquelético en ratones de esperanza de vida larga (C57BL/6) que en ratones de vida corta (SAM), de igual forma, la diferencia en cantidad de proteína reactiva a sulfidrilos fue significativamente mayor en tejido de hígado, riñón, corazón y músculo esquelético de ratones C57BL/6 que en ratones SAM. Se destaca la particularidad de que el tejido de ratones longevos está en condiciones más reductoras que el tejido de ratones con vida corta y curiosamente estos últimos muestran menor capacidad reductora por su baja concentración de proteína reactiva a sulfidrilos. No obstante esto no indica con seguridad que el envejecimiento sea una consecuencia del estado de oxidación celular, pues no es posible distinguir causa de efecto. Otros estudios han demostrado que no existe relación entre la capacidad de mantener un ambiente mitocondrial reductor y la longevidad, sobre todo en organismos pequeños como la mosca *Drosophila* (Miwa et al, 2004) y el gusano *Caenorhabditis elegans* (Clancy & Birdsall, 2013; Ranjan et al., 2013). También se ha buscado explicar mediante esta teoría la diferencia de longevidad entre el género femenino y el masculino en una misma especie (Magnani & Accorsi, 1993) y se ha propuesto la idea de que el nivel de estrógeno pudiese influir la capacidad reductora de la mitocondria. Sin embargo, no se observó diferencia en la longevidad de ratones C57BL/6 machos o hembras y no hay diferencia significativa entre los niveles de ERO mitocondriales (Sanz *et al.* 2006). Otras investigaciones han mostrado que la capacidad de mantener un potencial redox mitocondrial reductor en hembras es mayor al tener un alto nivel de expresión, así como de actividad, de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Borrás *et al.*, 2003). Se ha observado un importante incremento en las mutaciones del ADN mitocondrial en animales con vida corta, resultando en proteínas de la cadena respiratoria con función alterada. El mal funcionamiento de la cadena respiratoria resulta en la sobreproducción de ERO (Payne & Chinnery, 2015; Krishnan et al., 2008; Ritcher, 1995). Queda por responderse la pregunta: ¿qué es lo que propicia una menor vulnerabilidad a la mutación en el DNA mitocondrial de organismos longevos?.

EFECTO DEL POTENCIAL REDOX EN CULTIVOS CELULARES

El potencial redox en cultivos (PRC) celulares se refiere al balance entre las especies óxido-reductoras en el medio de cultivo, estas especies redox pueden ser moléculas producidas por la célula o adicionadas al reactor, como O_2, DTT, glutatión, etc. Como se muestra en la tabla I, existen estudios con el interés de determinar el efecto del potencial redox sobre la productividad y la calidad del producto en biorreactores, ésto representa una ventaja para el control de cultivos, pues el potencial redox es un parámetro relativamente fácil de medir en línea, que se ha propuesto para seguir cambios en tiempo real de otras variables que estén relacionadas como el crecimiento celular (Lin *et al*., 2010), viabilidad (Pluschkell & Flickinger, 1996; Eyer & Henzle, 1995) y metabolismo (Higareda *et al*., 1997).

Tabla I. Cultivos bajo control de PRC y su efecto en la producción.

Tipo de cultivo	Control de PRC	Efecto en el cultivo	Referencia
Quimiostato con aguas residuales (sintética) de composición conocida, alta en glucosa, K_2SO_4 y $NaHCO_3$, para la producción de biogas.	Dosificación de O_2 usando PR, controlado de -230 a -180mV, 50 y 100mV por encima del PR natural, respectivamente.	Durante la oxigenación a PR controlado, los sulfuros disueltos y gaseosos fueron completamente eliminados, lo que resultó en mayor producción de metano.	Khanal & Huang, 2002.
Reactor en lote secuencial para la remoción de amonio en aguas residuales de soya.	Control de aeración mediante PR. Correlación entre potencial redox y degradación de materia orgánica y oxidación de amonio.	Control de acumulación de nitrógeno en tiempo real, usando PR y pH. Disminución del amonio al 95%, como resultado de aeración controlada.	Gao *et al.*, 2007
Fermentación de *Candida tropicalis* para la producción de xilitol a partir de D-xilosa durante limitación de oxígeno.	Control de aeración y alimentación de glucosa mediante monitoreo de PR.	La máxima producción de xilitol se obtuvo a -180mV y una tasa de aeración de 0.21 min^{-1}	Sheu *et al.*, 2003.
Reactor en lote secuencial, alimentado dos veces, para la	Monitoreo en un rango de 0 a -500mV. Correlación entre	Indicador de nitrificación y desnitrificación del cultivo. La concentración mínima	Han *et al.*, 2008

desnitrificación de estiércol de puerco.	presencia de NO_3^-.N y PR.	de NO_3^-.N se encuentra entre -320 a -412mV (máxima desnitrificación).	
Fermentación en lote con *Actinobacillus succinogenes* NJ113 para la producción de ácido succínico.	Comparación de PR constante en cinco niveles: -100, -300, -350, -400 y -450mV con la adición de ferrocianuro de potasio (1g L^{-1}) y/o ditiotreitol (1g L^{-1}).	Se encontró que cuando el PR fue de -350mV, la productividad aumentó un 66%, dado que disminuye la fuga de sustrato hacia la formación de compuestos sin interés para la producción.	Li *et al.,* 2010
Cultivo en lote de hibridomas produciendo un anticuerpo monoclonal (AcM).	Control del PRC entre -130 y 70 mV utilizando mezclas de oxígeno y nitrógeno.	Las condiciones reductoras resultaron en mayor producción de AcM y concentración celular. La mayor velocidad de producción del AcM a PRC intermedios. PRC oxidantes indujeron apoptosis.	Meneses-Acosta *et al.*, 2012

Sabiendo que el potencial redox en el cultivo es resultado del balance entre diversos pares redox, Higareda *et al.* (1997) monitorearon el oxígeno disuelto (OD), pH y potencial redox de cultivos en lote de células de hibridoma murino, para la producción de un anticuerpo monoclonal. Encontraron distintos patrones de cambio de las tres variables cuando el cultivo se encontraba bajo limitación de glucosa (Glc) o glutamina (Gln), a diferencia de un cultivo con suficiente sustrato en el que hubo cambios relacionados a eventos operacionales. Ellos proponen dos ecuaciones para predecir el PRC con base en la especie redox O_2/H_2O_2, (fácilmente cuantificable por pH gracias al peróxido de hidrógeno), cuando OD es constante y cuando pH es constante. Sin embargo, es probable encontrar un comportamiento que no se ajuste las ecuaciones propuestas, lo cual denota que existen otras moléculas oxidantes y/o reductoras secretadas por las células que dominan en el cultivo, como en el caso de la limitación de Glc y Gln, sustratos importantes en el metabolismo celular, para los cuales valdría la pena ajustar un modelo especial, como lo destacan Lee *et al.* (1998). Estos modelos son valiosos al ser implementados como estrategia de control, para encontrar variaciones metabólicas en el cultivo que pudieran afectar la producción.

CONCLUSIONES

La medición del potencial redox en sistemas biológicos permite obtener información sobre el metabolismo celular, su estado energético e incluso predecir la viabilidad o longevidad. El surgimiento de nuevas tecnologías que nos permiten darle seguimiento a la evolución del potencial redox celular en tiempo real permiten entender los procesos celulares y como dependen del balance redox. Quedan aún muchas preguntas por responder, pues en la mayoría de las situaciones es difícil determinar si el potencial redox y la acumulación de ERO son los responsables de algún evento celular, o por el contrario, consecuencia de ese evento. Este campo seguirá siendo un importante tema de estudio que permitirá un mayor entendimiento de un amplio rango de eventos celulares e incluso a nivel orgánico. La biotecnología se beneficiará de este conocimiento al poder obtener productos en mayor cantidad y calidad a través del mayor entendimiento de los fenómenos redox que los rigen.

AGRADECIMIENTOS

Financiamiento PAPIIT UNAM IT200315 e IT201214. FJZB es alumna del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y recibe beca del CONACYT 384123. Agradezco a Shirley Ainsworth, Omar Arriaga, Javier Peza Villa y Alexa Milley Gómez Restrepo, responsables de poner a nuestra disposición los recursos de información científica y tecnológica del acervo institucional.

REFERENCIAS

Anderson M (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Method. Enzymol*. 113: 548-555.

Anfinsen C (1962) Some observations on the basic principles of design in protein molecules. *Comp. Biochem. Physiol.* 4: 229-240.

Atkin J, Farg M, Walker A, McLean C, Tomas D & Horne M (2008) Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 30: 400–407.

Austin C, Wen X, Gazzard L, Nelson C, Scheller R & Scales S (2005) Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody–drug conjugates, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (50): 17987–17992.

Ayer A, Gourlay C & Dawes I (2014) Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 14: 60–72.

Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó F & Viña J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biol. Med*. 34(5): 546–552.

Brookes P, Yoon Y, Robotham J, Anders M, Sheu S, (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *Am. J. Physiol.- Cell Ph.* 287: C817–C833.

Cai J & Jones D (1998) Superoxide in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 11401-11404.

Clancy D & Birdsall J (2013) Flies, worms and the Free Radical Theory of ageing. *Aging Res. Rev*. 12(1): 404-412.

Commoner B, Townsend J & Pake G (1954) Radicals in biological materials. *Nature* 4432: 689-691.

Crane F, Sun I & Sun E (1993) The essential functions of coenzyme Q. *Clin. Investig.* 71: S55- S59.

Edman J, Ellis L, Blacher R, Roth R & Rutter W (1985) Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 317: 267-270.

Eyer K & Heinzle E (1995). On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing in redox potential measurement. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 277-283.

Ezzi S, Urushitani M & Julien J (2007) Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J. Neurochem.* 102: 170–178.

Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.

Foyer C, Theodoulou F & Derlot S (2002) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants, *Trends Plant Sci.* 6(10): 486-492.

Gao D, Peng Y, Liang H & Wang P (2007) Using oxidation–reduction potential (ORP) and pH value for process control of shortcut nitrification-denitrification. *J. Environ. Sci. Heal. A* A38(12): 2933–2942.

García-Giménez J, Markovic J, Dasí F, Queval G, Schnaubelt D, Foyer C & Pallardó F (2013) Nuclear glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* 1830: 3304–3316.

Getzoff E, Tainer J, Weiner P, Kollman P, Richardson J & Rochardson D (1983) Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306: 287-290.

Go YM & Jones D (2008) Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 1273–1290.

Görlach A, Bertram K, Hudecova S & Krizanova O (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay, *Redox Biol.* 6: 260–271.

Goss S, Singh R & Kalyanaraman B (1999) Bicarbonate Enhances the Peroxidase Activity of Cu,Zn-Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 274: 28233-28239.

Han Z, Wu W, Zhu J & Chen Y (2008) Oxidization–reduction potential and pH for optimization of nitrogen removal in a twice-fed sequencing batch reactor treating pig slurry. *Biosyst. Eng.* 99: 273–281.

Hanson G, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi R, Tsien R & Remington J (2004) Investigating mitochondrial redox rotential with redox-sensitive green fluorescent protein indicator. *J. Biol. Chem.* 279: 13044–13053.

Harman D (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.

Harman D (1993) Free radical theory of aging: a hypothesis on pathogenesis of senile

dementia of the Alzheimer's type. Age 16: 23-30.

Higareda AE, Possani LD & Ramírez OT (1997) The Use of Culture Redox Potential and Oxygen Uptake Rate for Assessing Glucose and Glutamine Depletion in Hybridoma Cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 555-563.

Hudson D, Gannon S & Thorpe C (2014) Oxidative protein folding: From thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Rad. Biol. Med.* 80: 171-182.

Hutter D, Till B & Greene J (1997). Redox State Changes in Density-Dependent Regulation of Proliferation. *Exp. Cell Res.* 232: 435–438.

Hyun D, Lee M, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Halliwell B & Jenner P (2002) Effect of wild-type or mutant parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome, *J. Biol. Chem.* 277: 28572–28577.

Hwang C, Sinskey A, Lodish H (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257: 1496-1502.

Iqbal A, Paviani V, Moretti A, Laurindo F & Augusto O (2014) Oxidation, inactivation and aggregation of protein disulfide isomerase promoted by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of human superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 557: 72–81.

Jiang Z, Hu Z, Zeng L, Lu W, Zhang H, Li T & Xiao H (2011) The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? *Free Rad. Biol. Med.* 50: 907–917.

Karademir B, Corek C & Ozer N (2015) Endoplasmic reticulum stress and proteasomal system in amyotrophic lateral sclerosis. *Free Rad. Biol. Med.* 88: 42–50.

Karplus P & Shulz G (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 A resolution. *J. Mol. Biol.* 210: 163-180.

Kalinina E V, Chernow N & Novichknova E (2014) Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox dependent processes. *Biochemistry* 79: 1562-1583.

Kemp M, Go YM & Jones D (2007) Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Rad. Biol. Med.* 44: 921–937.

Khanal S & Huang, J (2002) ORP-based oxygenation for sulfide control in anaerobic treatment of high-sulfate wastewater. *Water Res.* 37: 2053–2062.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Mizuno Y, & Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature*. 392: 605-608.

Kolossov V, Hanafin W, Beaudoin J, Bica D, DiLiberto S, Kenis P & Gaskins H (2014) Inhibition of glutathione synthesis distinctly alters mitochondrial and cytosolic redox poise, *Exp. Biol. Med*. 239: 394–403.

Kolossov V, Beaudoin J, Ponnuraj N, DiLiberto S, Hanafin W, Kenis P & Gaskins H (2015) Thiol-based antioxidants elicit mitochondrial oxidation via respiratory complex III. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol*. 309: C81-C91.

Kosower N, Kosower E & Wertheim B (1969) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Com*. 37: 593-596.

Krishnan K, Reeve A, Samuels D, Chinner P, Blackwood J, Taylor R, Wanrooij S, Spelbrink J, Lightowlers R & Turnbull D (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Genet.* 40(3): 275-279.

Kurz T, Eaton J & Brunk U (2010) Redox Activity Within the Lysosomal Compartment: Implications for Aging and Apoptosis, *Antioxid. Redox Signal.* 13: 511-523.

Laurindo F, Pescatore L & Fernandes D (2012) Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Rad. Biol. Med.* 52: 1954–1969.

Lee T, Chang Y, Chung B & Park Y (1998) Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. *Biotechnol. Prog.* 14: 959-962.

Li J, Jiang M, Chen K, Ye Q, Shang L, Wei P, Ying H & Chang H (2010) Effect of redox potential regulation on succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33:911–920.

Lin Y, Chien W & Duan K (2010) Correlations between reduction–oxidation potential profiles and growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* during very-high-gravity fermentation. *Process Biochem.* 45: 765–770.

Magnani M & Accorsi A (1993) The female longevity phenomenon. Hypotheses on some molecular and cell biology aspects. *Mech. Ageing Dev*. 72: 89-95.

Maroz A, Anderson R, Smith R & Murphy M (2009) Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.* 46:105–109.

Meneses-Acosta A, Gómez A & Ramírez OT (2012) Control of redox potential in hybridoma cultures: effects on MAb production, metabolism and apoptosis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 1189-1198.

Mesecke N, Spang A, Deponte M & Herrmann J (2008) A Novel Group of Glutaredoxins in the cis-Golgi Critical for Oxidative Stress Resistance. *Mol. Biol. Cell* 19: 2673–2680.

Miwa S, Riyahi K, Partridge L & Brand M (2004) Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019: 388-391.

Nyquist S, Barr R & Morré D (1970) Ubiquinone from rat liver Golgi apparatus fractions. *Biochim. Biophys. Acta*. 208: 532-534.

Okumura M, Kadokura H & Inaba K (2015) Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Rad. Biol. Med.* 83: 314-322.

Payne B & Chinnery P (2015) Mitochondrial

dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 1347–1353.

Pluschkell S & Fickinger M (1996) Improved methods for investigating the external redox .potential in hybridoma cell culture. *Cytotechnol.* 19: 11-26.

Ranjan M, Gruber J, Ng L & Halliwell B (2013) Repression of the mitochondrial peroxiredoxin antioxidant system does not shorten life span but causes reduced fitness in *Caenorhabditis elegans*. *Free Rad. Bio. Med*. 63: 381-389.

Rebrin I & Sohal R (2004). Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevities. *Exp. Gerontol.* 39: 1513–1519.

Rigobello M, Folda A, Scutari G & Bindoli A (2005) The modulation of thiol redox state affects the production and metabolism of hydrogen peroxide by heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 441: 112–122.

Ritcher C (1995) Oxidative Damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell B*. 27(7): 647-653.

Rosenwasser S, Rot I, Meyer A, Feldman L, Jiang K & Friedman H (2010) A fluorometer-based method for monitoring oxidation of redox-sensitive GFP (roGFP) during development and extended dark stress *Physiol. Plantarum* 138: 493–502.

Sanz A, Hiona A, Kujoth G, Seo A, Hofer T, Kouwenhoven E, Kalani R, Prolla T, Barja G & Leeuwenburgh C (2006) Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Exp. Gerontol.* 42: 173–182

Scialo F, Mallikarjun V, Stefanatos R & Sanz A (2013). Regulation of Lifespan by the Mitochondrial Electron Transport Chain: Reactive Oxygen Species-Dependent and Reactive Oxygen Species-Independent Mechanisms. *Antiox. Redox Signal.* 19: 1953-1969.

Schwarzländer M, Fricker M, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove L, Hell R & Meyer A (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells, *J. Microsc*. 231: 299–316.

Sheu D, Duan K, Jou S, Chen Y & Chen C (2003) Production of xylitol from *Candida tropicalis* by using an oxidation-reduction potential-stat controlled fermentation. *Biotechnol. Let.* 25: 2065–2069.

Sies H (1982) Metabolic Compartmentation. Academic Press, Toronto pp. 205–231.

Siegel G, Ermilov E, Pries A, Winkler K, Schmidt A, Ringstad L, Malmsten M & Lindman B (2014) .significance of lipid peroxidation in cardiovascular disease. *Colloid. Surface. A.* 442: 173–180.

Thorpe C, Hoober K, Raje S, Glynn N, Burnside J, Turi G & Coppock D (2002) Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 1–12.

Vanoevelen J, Dode L, Baelen K, Fairclough R, Missiaen L, Raeymaekers L & Wuytack F (2005) The Secretory Pathway Ca^{2+}/Mn^{2-} ATPase 2 Is a Golgi-localized Pump with High Affinity for Ca^{2+} Ions. *J. Biol. Chem.* 280: 22800–22808.

Cultivo de Células Animales Sincronizadas en Biorreactores como un Nuevo Modo de Operación para Optimizar la Producción de Proteínas Recombinantes

Elena Mendoza[1]; Vanessa Hernández[2] y José A. Serrato*[1]

*[1]Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Departamento de Bioquímica. Calzada de Tlalpan 4502 Col. Sección XVI C.P 14080, Tlalpan D.F. [2] Instituto de Biotecnología, UNAM. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210. *Author para correspondencia: jaserrato@iner.gob.mx*

RESUMEN

La ingeniería del cultivo de células animales representa hoy día la tecnología estándar para la producción de múltiples proteínas recombinantes terapéuticas. No obstante, aun es necesario realizar investigación para optimizar los procesos de producción, con la finalidad de abatir el costo de dichos medicamentos. La investigación en el área se centra en aumentar la cantidad y calidad de dichas proteínas mediante cultivos celulares convencionales, sin tomar en cuenta que dicho acercamiento no permite identificar procesos específicos de determinada fase del ciclo celular que sean potencialmente relevantes para mejorar la cantidad o calidad de las proteínas recombinantes producidas. En el presente trabajo se hace una revisión de estudios recientes que muestran el cultivo de células animales sincronizadas como un nuevo modo de operación para el estudio detallado, en las diferentes fases del ciclo celular, de los múltiples procesos celulares implicados en la producción de proteínas recombinantes. Se muestra que la elutriación centrífuga a contracorriente es el método de sincronización seleccionado para dicho propósito, el cual acoplado a sistemas de cultivo en biorreactores permite obtener poblaciones celulares altamente sincronizadas, bajo condiciones de cultivo controladas y a concentraciones celulares que permiten múltiples muestreos y determinaciones analíticas. Mediante dicho acercamiento se han identificado diferencias en el comportamiento cinético y metabólico de la población celular, en contraste con lo observado hasta la fecha en cultivos convencionales no sincronizados. Así, el cultivo de células animales sincronizadas en biorreactores podría representar en el futuro una estrategia para el estudio y optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes.

Palabras clave: Sincronización celular, Ciclo celular, Elutriación centrífuga, Cultivo celular, Células animales

ABSTRACT

Nowadays, cell culture of animal cells is the standard technology for the production of a large number of therapeutic proteins. As result of the interest to optimize the production of recombinant proteins generated by cell culture, research in the field has been focuse on the improvement of quantity and quality of such proteins using cell cultures whose population, however, is highly segregated in the different phases of the cell cycle. As consequence, the results observed are the sum of all the processes involved in protein production during all phases of the cell cycle. Recent literature shows that performing synchronized animal cell cultures represents a novel strategy to study, through each of the cell cycle phases, the contribution of all the processes implicated in recombinant protein production. The aim of the present article is to review the state of the art in synchronized culture of animal cells that could represent a strategy to optimize the production of recombinant proteins in the near future.

Key words: cell synchronization, cell cycle, centrifugal elutriation, cell culture, animal cells

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas tres décadas ha habido avances sustanciales en la ingeniería del cultivo de células animales a nivel tal que es la tecnología estándar para la producción de un número importante de proteínas recombinantes de uso terapéutico, principalmente anticuerpos monoclonales (Ozturk, 2006). En la actualidad, la investigación en el campo se ha centrado en optimizar la cantidad (Lara et al., 2006) y más recientemente la calidad de las proteínas recombinantes producidas (Du et al., 2014; Hossler, 2012). Tradicionalmente, para el estudio y optimización de la producción de proteínas recombinantes se emplean cultivos que son altamente heterogéneos con respecto al ciclo celular del ente biológico. Lo anterior se explica por la naturaleza proliferante de las líneas celulares que se utilizan en cultivo celular. Si bien durante la etapa de crecimiento exponencial de un cultivo convencional las células se encuentran en crecimiento balanceado, la población está altamente segregada en las diferentes fases del ciclo celular, por tanto, los resultados obtenidos no proporcionan información respecto del estado fisiológico y metabólico de las células durante su progresión en las diferentes fases del ciclo celular. La realización de cultivos homogéneos con respecto a la población celular y bajo condiciones de cultivo controladas permite conocer, en las diferentes fases del ciclo celular, la contribución de múltiples procesos como la regulación y expresión génica, la secreción y el patrón de glicosilación, etc. implicados en la producción de proteínas, con la finalidad de optimizar los proceso de producción de proteínas recombinantes. El presente trabajo hace una revisión de estudios recientes de cultivo de células animales sincronizadas en biorreactores como un nuevo modo de operación en ingeniería del cultivo celular y que puede representar en el futuro una estrategia para optimizar los procesos de producción de proteínas recombinantes.

CICLO CELULAR

El ciclo celular es un proceso iterativo en el

que una célula da origen a dos células idénticas; se divide en cuatro fases en virtud de la especificidad de los procesos celulares que se llevan a cabo en cada una: fase G1, fase S (síntesis de ácidos nucleicos), fase G2 y fase M (mitosis) (Israels & Israels, 2001). Durante la fase G1 se ha observado que la célula aumenta su masa y produce grandes cantidades de proteína y ARN. Durante la fase G1 temprana se presenta una acumulación de proteína tres a cinco veces mayor que en el resto de la fase, además de un gasto energético considerable que es necesario para transitar satisfactoriamente a la fase S (Kromenaker & Srienc, 1991). Durante la fase S se lleva a cabo principalmente la replicación de ADN, los daños al mismo son reparados y es la fase en donde se asegura que el material genético se ha duplicado una sola vez. En esta fase la célula está provista del doble de proteínas nucleares y no presenta un incremento neto en la producción de proteína debido a los procesos de secreción y degradación. La fase G2 es una segunda fase de crecimiento en donde continúa la síntesis de proteínas y ARN, la célula sintetiza las proteínas necesarias para la segregación cromosómica y la división celular durante la mitosis, por tanto se convierte en una célula diploide y se observa un cambio en la estructura celular que indica el principio de su división. Durante la fase M la célula experimenta dos procesos importantes, el primero de ellos es la mitosis, en donde las cromátidas hermanas se separan y segregan en dos núcleos hijos idénticos cada uno de ellos con su propia copia de genoma. En el segundo proceso denominado citocinesis, la maquinaria celular y el metabolismo están centrados en la reorganización de la infraestructura celular (Abu-Absi & Srienc, 2002), la célula finaliza su división dando origen a dos células idénticas (Alberts et al., 2008). En un ciclo típico de división celular de aproximadamente 24 horas, las fases G1, S, G2, y M durarían aproximadamente 10, 9, 4 y 1 horas respectivamente, sin embargo, dicho periodo varía y es específico para cada línea celular. Incluso, entre células del mismo linaje puede haber variaciones debido a cambios que se presentan durante la progresión del ciclo como es el caso de células que se arrestan en la fase G0 o bien por cambios en la duración de la fase G1 (Lloyd & Al-Rubeai, 1999). De acuerdo con lo arriba expuesto, es relevante poder estudiar de forma independiente los procesos que se llevan a cabo en cada una de las diferentes fases del ciclo celular con el objetivo de identificar aquellos directamente implicados en la cantidad y calidad de las proteínas recombinantes y poder utilizar dicha información para optimizar su proceso de producción.

SINCRONIZACIÓN CELULAR

Existe una tendencia natural de los cultivos celulares a crecer de forma no sincronizada, es decir, la población celular prolifera continuamente segregada en las diferentes fases del ciclo celular (**Fig. 1**). Lo anterior es resultado de las variaciones estocásticas en los tiempos de interdivisión durante el ciclo celular, como la heterogeneidad observada en la duración de la fase G1, que provocan que a través del tiempo un cultivo sincronizado pierda

la sincronía (Cooper, 2003). Un cultivo sincronizado se puede definir como aquel en donde se consigue que una población celular homogénea transite de manera uniforme a través de las diferentes fases del ciclo celular y se divida al mismo tiempo.

Se han descrito diferentes criterios que pueden definir la sincronía de un cultivo celular (Cooper & Shedden, 2003). A continuación se enuncian los más representativos:

- El comportamiento celular debe ser igual tanto en un cultivo sincronizado como en un cultivo no sincronizado.
- El crecimiento celular no se debe ver afectado después de la sincronización.
- Mínimo incre mento en la concentración celular durante la interfase (G1, S y G2).
- Contenido de ADN y distribución de tamaño estrechos y tiempos de duplicación comparables.

Métodos de sincronización

Teóricamente, los procedimientos de sincronización celular deben permitir obtener poblaciones de células homogéneas en una determinada fase del ciclo celular. Se pueden dividir en dos grupos (Banfalvi, 2011; Lloyd et al., 2000). El primer grupo se basa en detener la progresión del ciclo mediante la exposición de las células a tratamientos químicos o físicos que arrestan a las células en una determinada fase del ciclo celular. Dichos tratamientos, sin embargo, pueden alterar el metabolismo y la fisiología celular (Cooper, 2002, 2003; Urbani, 1995). Se han realizado estudios para mejorar la producción de proteínas recombinantes en células de mamífero que han sido arrestadas mediante agentes químicos en alguna fase del ciclo celular con la finalidad de incrementar la expresión de proteínas (Sunley & Butler, 2010; Kummar et al., 2007; Li et al., 2006; Ma et al., 2008). Sin embargo, el empleo de agentes químicos de arresto celular alteran de manera importante el metabolismo y la fisiología celular

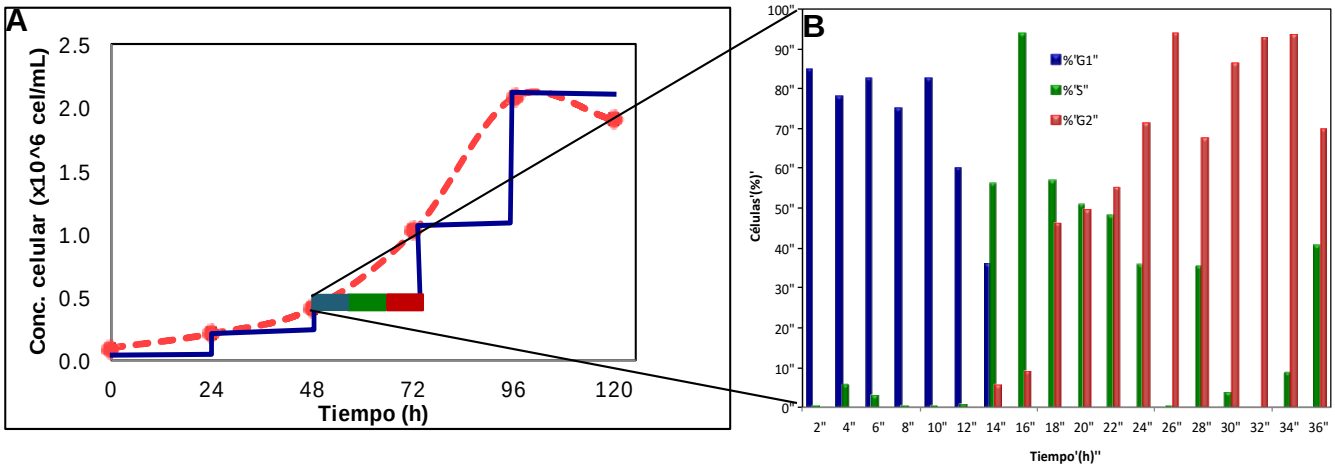


Fig.1. A. Perfil de crecimiento celular típico de una población de células heterogéneas, es decir, no sincronizadas (línea roja) vs perfil hipotético de crecimiento celular sincronizado, es decir, perfil de crecimiento escalonado (línea azul). **B.** Distribución del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular durante un ciclo de duplicación en un cultivo sincronizado.

y como consecuencia de ello los resultados obtenidos revelan información que no es específica de la fase del ciclo en donde las células fueron detenidas, si no de los cambios y alteraciones que ha sufrido la célula durante su proceso de arresto.

El segundo grupo se basa en el uso de métodos de separación que aprovechan las propiedades físicas o biológicas de la población celular (tamaño, densidad, área superficial, contenido de ADN, proteínas intracelulares o de membrana, etc.) para purificar o separar poblaciones con las mismas características (Dutton et al., 2006). De entre los múltiples métodos de separación se encuentra la elutriación centrífuga a contracorriente, la cual representa un método ideal para la obtención de altas concentraciones de células sincronizadas en virtud de que se trata de un método preparativo, puede operarse bajo condiciones asépticas y sobretodo porque la alteración al metabolismo y la fisiología celular es mínimo (Grosse et al., 2012; Rosas, 2013). El principio de operación consiste en separar a las células en función de su velocidad de sedimentación (determinado por su volumen y densidad) en un sistema de fuerza centrífuga en un sentido y flujo de fluído en sentido contrario. La suspensión celular heterogénea se hace fluir en contra de un campo gravitacional dentro de una cámara de separación (o de elutriación), donde cada célula se posicionará espacialmente en el punto donde su velocidad de sedimentación esté en equilibrio con la velocidad de flujo de fluído en una posición radial determinada de la cámara. Células de mayor densidad y tamaño se ubican en el fondo de la cámara (entrada de la cámara) y las más pequeñas en la parte cercana a la frontera de elutriación (salida de la cámara). Una vez que toda la población celular se encuentra dentro de la cámara de elutriación y separado de acuerdo a su velocidad de sedimentación, es posible mediante el incremento progresivo del flujo de fluído de elutriación, ir colectando poblaciones celulares homogéneas en tamaño y densidad creciente (Lindhal, 1956; Grosse et al., 2012). En virtud de que existe una relación directa entre el contenido de ADN (indicativo de la fase del ciclo celular) y el tamaño de la célula, la elutriación centrífuga a contracorriente permite separar poblaciones celulares homogéneas en las diferentes fases del ciclo celular. La utilización del método de elutriación centrífuga a contracorriente como estrategia para obtener poblaciones celulares sincronizadas ha sido de suma importancia para el estudio de múltiples procesos específicos implicados en cada una de las fases del ciclo celular (Simanis & Nurse, 1989).

ESTADO ACTUAL DEL CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES EN BIOREACTORES

El desarrollo de la ingeniería de cultivo celular en biorreactores comenzó a mediados de los años cincuenta en respuesta a la necesidad de técnicas de cultivo en masa que fueran adecuadas para la producción de vacunas. Los primeros biorreactores fueron diseñados específicamente para el cultivo de células adherentes, sin embargo, los primeros productos de interés comercial se generaron mediante cultivo de células en suspensión.

Esto estimuló la adaptación de los sistemas de cultivo en biorreactores que eran utilizados para el cultivo microbiano, para su uso en sistemas biológicos de mayor sensibilidad mecánica. El éxito terapéutico de las proteínas recombinantes generadas por medio de la tecnología del ADN recombinante, como por ejemplo los anticuerpos monoclonales (AcM) en los años ochenta y noventa, impulsó el desarrollo de una gran variedad de biorreactores y de sistemas de cultivo para el cultivo celular en suspensión haciendo especial énfasis en el incremento del rendimiento del producto obtenido a través de un mejor suministro de nutrientes y eliminando productos de desecho. El objetivo de implementar sistemas especializados de cultivo en biorreactor fue minimizar las limitaciones que se presentan en el cultivo celular (por ejemplo un bajo rendimiento en la densidad celular final) proporcionando a las células un ambiente que les permitiese de manera continua generar el producto de interés en altas concentraciones (Fenge & Lullau, 2006). A la fecha, el cultivo de células animales en biorreactores es parte fundamental de la industria farmacéutica para la producción de proteínas terapéuticas debido a la creciente demanda y estrictos requisitos de calidad con las que debe cumplir el producto (Ozturk, 2014). Actualmente, existe una tendencia de realizar los cultivos de células animales en biorreactores desechables. La finalidad de implementar dichos dispositivos es minimizar la contaminación, el tiempo de limpieza y esterilización, además de promover la eficiencia de los procesos y en consecuencia la reducción de tiempo de comercialización de nuevos productos (ej. proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales para terapia y diagnóstico) (Eibl & Eibl, 2014). En el área de ingeniería de cultivo celular en biorreactores a gran escala no se ha visualizado la necesidad de realizar cultivos tanto homogéneos con respecto a las condiciones medioambientales de cultivo, como de la población celular. Sin embargo, recientemente se han publicado algunos estudios donde se realizan cultivos de células sincronizadas en biorreactores de laboratorio, los cuales reflejan una nueva tendencia de estudiar y conocer, de manera detallada en las diferentes fases del ciclo celular, la contribución de múltiples procesos implicados en la producción de proteínas recombinantes (Barradas et al., 2014; Barrios, 2014; Mendoza, 2014; Mendoza-Pérez et al. 2016).

CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES SINCRONIZADAS EN BIOREACTORES

Existe evidencia de que la manipulación a nivel de ciclo celular de líneas celulares, se ha empleado como estrategia para optimizar la producción de proteínas recombinantes (Kumar et al., 2007). También, múltiples grupos de investigación han aprovechado las ventajas que ofrece la elutriación centrífuga a contracorriente para separar células en determinada fase del ciclo celular y estudiar aspectos celulares básicos sin el objetivo de cultivar las células sincronizadas (Bauer, 1999; Zickert et al., 1993). Feder et al., (1989) mediante elutriación centrífuga obtuvieron poblaciones homogéneas de células CHO con el objetivo de evaluar el patrón de expresión de

la enzima dihidrofolato reductasa (DHRF) y sus niveles de ARNm en las diferentes fases del ciclo celular. La investigación concluyó que la actividad y expresión de la enzima DHRF no cambia a través de las fases del ciclo celular por lo que no puede considerarse una enzima regulada por ciclo. Kauffman et al., (1990) realizaron modificaciones al sistema tradicional de inyección celular y de fluídos del sistema de elutriación centrífuga a contracorriente. Evaluaron la actividad de la enzima cinasa de timidina de poblaciones de células HeLa, human 143tk y fibroblastos murinos Ltk^- en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular y determinaron que la elutriación centrífuga a contracorriente es el método físico de separación ideal para enriquecer poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular con mínimas perturbaciones fisiológicas. Wahl & Donaldson, (2001) evaluaron la capacidad de dos rotores con cámara de elutriación estándar para obtener poblaciones celulares sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular de la línea WEHI-231. Determinaron que ambos rotores tienen la capacidad de separar células en las diferentes fases del ciclo celular con alta pureza. Pocos estudios existen respecto de cultivos sincronizados de células animales. Thornton et al., (2002) emplearon un dispositivo de sincronización celular denominado “baby machine” para estudiar el comportamiento de un cultivo sincronizado de células hematopoyéticas de ratón recién nacido L1210. Observaron que dichas células pudieron mantener un perfil de crecimiento sincronizado durante 35 horas de cultivo, sin embargo, no realizaron más determinaciones analíticas. Lloyd et al., (2000) utilizaron la elutriación centrífuga como método de sincronización celular para estudiar la velocidad de producción de proteínas recombinantes con líneas celulares de importancia comercial, sin embargo, las células sincronizadas fueron cultivadas únicamente por dos horas después de la separación y en un sistema de cultivo estático. Rosas (2013) evaluó y demostró que el proceso de elutriación centrífuga a contracorriente permite obtener células animales sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular con alto grado de pureza y con capacidad para proliferar de manera sincronizada por al menos dos ciclos de duplicación, sin embargo, al igual que en el trabajo de Lloyd et al., (2000), se utilizó un sistema de cultivo estático de bajo volumen y no fue posible realizar determinaciones analíticas en el cultivo sincronizado (ej., consumo y producción de metabolitos, expresión de proteína recombinante, etc.), además de no poder controlar rigurosamente las variables medioambientales del cultivo. Recientemente, Barradas et al., (2014) y Jandt et al., (2014) emplearon como método de sincronización celular la elutriación centrífuga a contracorriente para enriquecer poblaciones de células de mamífero en las diferentes fases del ciclo celular con la posibilidad de cultivarlas en crecimiento sincronizado en biorreactores. Mendoza (2014)

por su parte, desarrolló un sistema y un proceso para realizar cultivos de células animales sincronizadas con respecto al ciclo celular bajo condiciones de cultivo controladas y predeterminadas de oxígeno disuelto, pH, temperatura y agitación, a altas concentraciones celulares y volúmenes de cultivo (**Fig. 2**). Dicho sistema y proceso ofrece importantes ventajas sobre los sistemas tradicionales de cultivo celular. Al acoplar un sistema de separación celular a dos sistemas independientes de cultivo celular en minibiorreactores (tanto para células no sincronizadas como para células sincronizadas) es posible sincronizar altas concentraciones celulares que permiten realizar cultivos de células homogéneas en su fisiología y metabolismo, a concentraciones celulares y volúmenes de cultivo suficientes para realizar múltiples muestreos y diferentes determinaciones analíticas (Mendoza-Pérez et al., 2016).

Barrios, (2014) evaluó el perfil de consumo de glucosa y glutamina, así como la producción de lactato en cultivos sincronizados de una línea celular de hibridoma murino (BCF2) a una concentración celular inicial de ca. 0.3×10^6 cel mL^{-1}. Los cultivos sincronizados se llevaron a

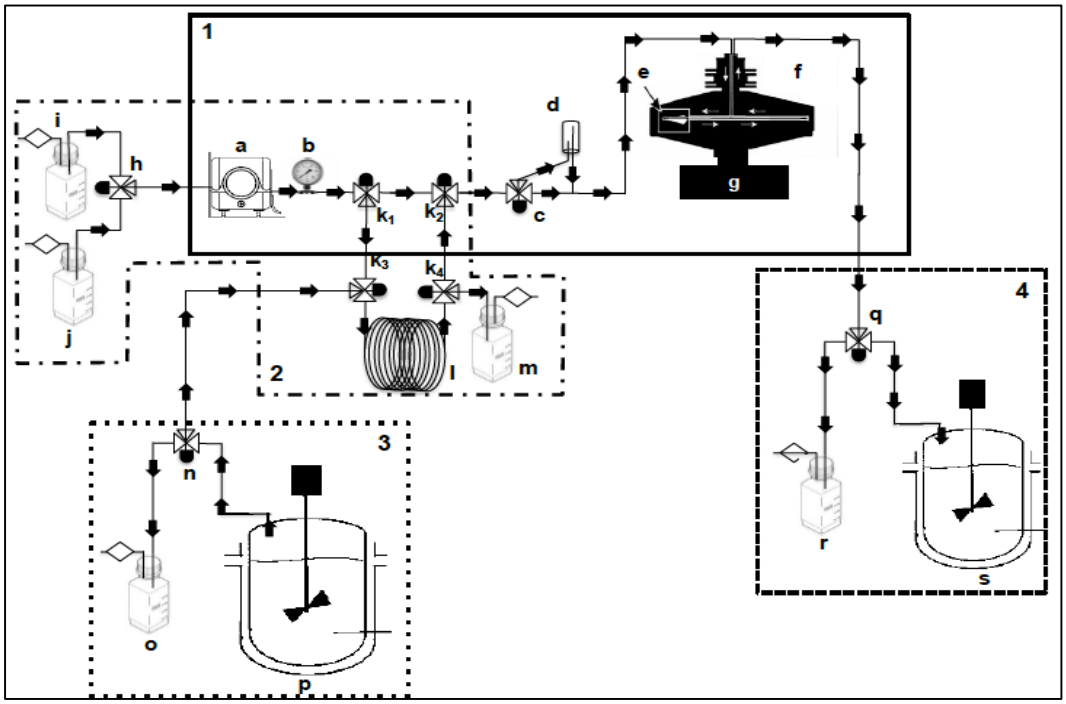


Fig.2. Esquema del sistema de cultivo de células sincronizadas. **1. Sistema de elutriación centrífuga a contracorriente: a)** Bomba peristáltica; **b)** Indicador de presión; **c)** Válvula de derivación; **d)** Trampa de burbujas; **e)** Cámara de elutriación estándar; **f)** Rotor JE-6B (Beckman Instruments); **g)** Ultracentrífuga J2-21. **2. Sistema de inyección de células: h)** Válvula de solución amortiguadora; **i)** Depósito de solución amortiguadora de elutriación; **j)** Depósito de medio de cultivo; **k_1-k_4)** Arreglo de válvulas de inyección; **l)** Columna de inyección; **m)** Depósito de desecho de la columna de inyección **3. Sistema de cultivo en suspensión: n)** Válvula de llenado; **o)** Depósito del inóculo del minibiorreactor; **p)** Minibiorreactor instrumentado de 500 mL. **4. Sistema de cultivo en suspensión: q)** Válvula de separación; **r)** Depósito de desecho; **s)** Minibiorreactor instrumentado de 250 mL**.** En todos los casos **)** Válvula de policarbonato de tres vías**.** ◇ **)** Filtro de 0.22 µm. Tomado de la solicitud de patente MX/a2015/001503.

cabo empleando el sistema de cultivo de células animales sincronizadas desarrollado por Mendoza, (2014) (Mendoza-Pérez et al., 2016). Las células crecieron de forma sincronizada durante dos ciclos de duplicación y se observó un incremento en el rendimiento lactato/glucosa con respecto a un cultivo no sincronizado. No observaron diferencias en las tasas de consumo/producción de metabolitos entre las diferentes fases del ciclo celular a dichas concentraciones celulares. García (2015) realizó una comparación del comportamiento cinético entre cultivos tradicionales de células CHO-S en crecimiento exponencial no sincronizado y cultivos sincronizados mediante elutriación centrífuga a contracorriente. Los cultivos se realizaron en frascos spinner con un volumen de trabajo de 20 mL y una concentración celular inicial entre 1.5-2x10^6 cel mL^{-1}. En los cultivos sincronizados, se determinó una mayor velocidad específica de consumo de glucosa, sin embargo, la producción de lactato y el rendimiento lactato/glucosa fueron menores, lo cual indicó un metabolismo de glucosa más acelerado, pero más eficiente.

CONCLUSIONES

Las células, durante su progresión a través de las diferentes fases de ciclo celular, realizan múltiples y muy diferentes procesos metabólicos y fisiológicos, los cuales no pueden ser estudiados mediante los cultivos celulares convencionales. Los cultivos de células sincronizadas en cambio, sí permiten estudiar e identificar procesos específicos de cada fase del ciclo celular que sean potencialmente relevantes para mejorar la cantidad o calidad de las proteínas recombinantes producidas.

De los métodos de sincronización existentes, la elutriación centrífuga a contracorriente ha demostrado ser el método de sincronización ideal para obtener poblaciones celulares en una determinada fase del ciclo celular con alta pureza y capaces de progresar de manera sincronizada, el cual acoplado a sistemas de cultivo en biorreactores permite cultivar dichas poblaciones bajo condiciones de cultivo controladas y a concentraciones celulares que permiten realizar múltiples muestreos y determinaciones analíticas.

A la fecha, hay muy pocos estudios de cultivos sincronizados de células animales y sólo un par de ellos han utilizado el cultivo en biorreactores para controlar las condiciones de cultivo. No obstante, mediante dicho acercamiento se han identificado diferencias importantes en el comportamiento cinético y metabólico de la población celular, en contraste con lo observado hasta la fecha en cultivos convencionales no sincronizados.

El cultivo de células animales sincronizadas en biorreactores representa un nuevo modo de operación para el estudio detallado, en las diferentes fases del ciclo celular, de los múltiples procesos celulares implicados en la producción de proteínas recombinantes y podría representar en el futuro cercano una estrategia para la optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes, sin embargo, aun hace falta realizar mucha investigación al respecto.

REFERENCIAS

Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2008) The cell cycle. In: Molecular Biology of the Cell. Anderson M. & Granum S. (eds). Garland Science. USA. pp. 1053-1114. ISBN 0-8153-3218-1

Abu-Absi NR & Srienc F (2002) Instantaneous evaluation of mammalian cell culture growth rates through analysis of the mitotic index. *J. Biotechnol.* 95(1):63-84.

Banfalvi G (2011) Overview of cell synchronization. In: Methods in Molecular Biology. Cell Cycle Synchronization: Methods and Protocols. Banfalvi G. (ed). Humana Press. USA. pp. 1-23. ISBN 978-1-61779-182-6

Barradas OP, Jandt U, Becker M, Bahnemann J, Pörther R & Zeng AP (2014) Synchronized mammalian cell culture: part I--a physical strategy for synchronized cultivation under physiological conditions. *Biotechnol. Prog.* 31(1):165-174.

Barrios A (2014) Caracterización cinética del crecimiento y metabolismo de células animales en cultivos sincronizados en minibiorreactores. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. pp. 1-76

Bauer J (1999) Advances in cell separation: recent developments in counterflow centrifugal elutriation and continuous flow cell separation. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 722(1-2):55-69.

Cooper S (2002) Reappraisal of G1-phase arrest and synchronization by lovastatin. *Cell Biol. Int.* 26(8):715-727.

Cooper S (2003) Rethinking synchronization of mammalian cells for cells cycle analysis. *Cell and Mol. Life. Sci.* 60(6):1099-1106.

Cooper S & Shedden K (2003) Microarray analysis of gene expression during the cell cycle. *Cell Chromosome* 2(1):1-12.

Du Z, Treiber D, McCarter J, Yadlin D, Saleem R, McCoy R, Zhang Y, Tharmalingam T, Leith M, Follstad BD, Dell B, Grisim B, Zupke C, Heath C, Morris AE & Reddy P (2014) Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 112(1):141-155.

Dutton RL, Scharer J & Moo-Young M (2006) Cell cycle phase dependent productivity of a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology* 52(1):55-69.

Eibl R & Eibl D (2014) Disposable bioreactors for inoculum production and protein expression. In: Animal Cell Biotechnology. Methods and Protocols, Pörtner R. (ed). Humana Press. USA. pp. 322-335. ISBN 1-58829-660-1

Feder J, Assaraf Y, Seamer L & Schimke R.(1989) The pattern of dihydrofolate reductase expression through the cell cycle in rodent and human cultured cells. *J. Biol. Chem.* 264(34):20583-20590.

Fenge Ch & Lüllau E (2006) Cell culture biorreactors. In: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, Ozturk S & Hu WS (eds). Taylor and Francis. USA. pp. 155-158. ISBN 0-8247-5334-8

García J (2015) Estudio del consumo y

producción de metabolitos de células CHO-S en cultivos sincronizados. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-79.

Grosse J, Meier K, Bauer T, Eilles Ch & Grimm D (2012) Cell separation by countercurrent centrifugal elutriation: recent developments. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 42(3):217-233.

Hossler P (2012) Protein glycosylation control in mammalian cell culture: past, precedents and contemporary prospects. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 127:187-219.

Israels ED & Israels LG (2001) The cell cycle. *Stem Cells* 19(1):88-91.

Kauffman M, Noga S, Kelly T & Donnenberg A (1990) Isolation of cell cycle fractions by counterflow centrifugal elutriation. *Anal. Biochem.* 191(1):41-46.

Kromenaker S & Srienc F (1991) Cell-cycle-dependent protein accumulation by producer and nonproducer murine hybridoma cell lines: a population analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 38(6):665-677.

Kumar N, Gammell P & Clynes M (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology* 53(1-3):33-46.

Jandt U, Barradas OP, Pörther R & Zeng AP (2014) Synchronized mammalian cell culture: part II--population ensemble modeling and analysis for development of reproducible processes. *Biotechnol. Prog.* 31(1):175-185.

Lara AR, Galindo E, Ramírez OT & Palomares LA (2006) Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells. *Mol. Biotechnol.* 34(3):355-81.

Li J, Sun X & Zhang Y (2006). Improvement of hepatitis B surface antigen expression by dimethyl sulfoxide in the culture of recombinant chinese hamster ovary cells. *Process Biochem.* 41:317-322.

Lindahl P (1948) Principle of a counter-streaming centrifuge for the separation of particles of different sizes. *Nature* 161(4095): 648.

Lloyd D & Al-Rubeai M (1999) Cell cycle. In: Encyclopedia of Bioprocess Technology. Spier RE (ed). John Wiley & Sons. New York, USA pp. 465-559.

Lloyd D, Holmes P, Jackson L, Emery A & Al-Rubeai M (2000) Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology* 34(1-2):59-70.

Ma Z, Yi X & Zhang Y (2006) Enhanced intracellular accumulation of recombinant HBsAg in CHO cells by dimethyl sulfoxide. *Process Biochem.* 43:690-695.

Mendoza J (2014) Desarrollo de un sistema de cultivo de células animales sincronizadas como una estrategia para el estudio y optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp.1-77.

Mendoza-Pérez E, Hernández V, Palomares LA & Serrato JA (2016) An integrated system to perform synchronous culture of animal

cells under controlled conditions. *Biotechniques* (en prensa).

Ozturk S (2006) Cell culture technology-an overview. In: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell Based Therapies, Ozturk S. & Hu W.S. (eds) Taylor and Francis. USA. pp. 1-13. ISBN 0-8247-5334-8

Ozturk S (2014) Equipment for large- scale mammalian cell culture. In: Mammalian Cell Culture for Biologics Manufacturing, Weichang Z. & Kantardiieff A. (eds). Springer. USA. pp. 69-82. ISBN 978-3-642-54050-9

Rosas R (2013) La elutriación centrifuga como un método de sincronización de hibridomas murinos BCF2 en las diferentes fases del ciclo celular. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. pp. 1-68.

Simanis V & Nurse P (1986) The cell cycle control gene cdc2^{+} of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell Press* 45(2):261-268.

Sunley K & Butler M (2010) Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotecnol. Adv*. 28(3):385-394.

Thornton M, Eward KL & Charles EH (2002). Production of minimally disturbed synchronous culture of hematopoietic cells. *Biotechniques* 32(5):1098-1100.

Urbani L, Sherwood S & Schimke R (1995) Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle. progression by drugs employed in cell synchronization. *Exp. Cell Res.* 219(1):159-168.

Whal A & Donaldson K (2001) Centrifugal elutriation to obtain synchronous populations of cellsab. In: Current Protocols in Cell Biology. Dasso M. (ed). J. Wiley and Sons, Inc . USA. pp. 8.5.1-8.5.16. ISBN 97804711433031

Zickert P, Wejde J, Skog S, Zetterberg A & Larsson O (1993) Growth-regulatory properties of G1 cells synchronized by centrifugal elutriation. *Exp. Cell Res*. 207(1):115-124

www.smbb.com.mx